

3657



PATENT  
1422-0506P

IN THE U.S. PATENT AND TRADEMARK OFFICE

# 6

Applicant: MINENO, Junichi et al. Conf.: 9784  
Appl. No.: 09/989,420 Group: Unassigned  
Filed: November 21, 2001 Examiner: Unassigned  
For: GENOMIC DNA LIBRARY

RECEIVED

DEC 18 2001

GROUP 3600

L E T T E R

Assistant Commissioner for Patents  
Washington, DC 20231

December 13, 2001

Sir:

Under the provisions of 35 U.S.C. § 119 and 37 C.F.R. § 1.55(a), the applicants hereby claim the right of priority based on the following application:

<u>Country</u>	<u>Application No.</u>	<u>Filed</u>
JAPAN	2001-137858	May 8, 2001

A certified copy of the above-noted application is attached hereto.

If necessary, the Commissioner is hereby authorized in this, concurrent, and future replies, to charge payment or credit any overpayment to Deposit Account No. 02-2448 for any additional fee required under 37 C.F.R. §§ 1.16 or 1.17; particularly, extension of time fees.

Respectfully submitted,

BIRCH, STEWART, KOLASCH & BIRCH, LLP

By   
Marc S. Weiner, #32,181

MSW:bmp  
1422-0506P

P.O. Box 747  
Falls Church, VA 22040-0747  
(703) 205-8000

Attachment

Bindi, Stewart, Kolesar, Bindi, LLP  
703/205-8000  
Filed: 11-21-2001  
Appn. 09/989,420  
Miveno et al

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE



別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日  
Date of Application:

2001年 5月 8日

出 願 番 号  
Application Number:

特願2001-137858

出 願 人  
Applicant(s):

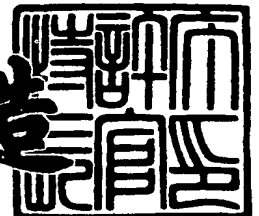
寶酒造株式会社  
国立がんセンター総長  
医薬品副作用被害救済・研究振興調査機構

RECEIVED  
DEC 18 2001  
GROUP 3600

2001年11月26日

特 許 庁 長 官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

及 川 耕 造



出証番号 出証特2001-3103983

【書類名】 特許願

【整理番号】 TS-13-004

【特記事項】 特許法第30条第1項の規定の適用を受けようとする特  
許出願

【提出日】 平成13年 5月 8日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N 15/10  
C12P 19/34

【発明者】

【住所又は居所】 滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 寶酒造株式会社 中  
央研究所内

【氏名】 峰野 純一

【発明者】

【住所又は居所】 滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 寶酒造株式会社 中  
央研究所内

【氏名】 浅田 起代蔵

【発明者】

【住所又は居所】 滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 寶酒造株式会社 中  
央研究所内

【氏名】 加藤 郁之進

【発明者】

【住所又は居所】 東京都中央区築地五丁目1番1号 国立がんセンター内

【氏名】 田邊 智佳子

【発明者】

【住所又は居所】 東京都中央区築地五丁目1番1号 国立がんセンター内

【氏名】 佐々木 博己

【発明者】

【住所又は居所】 東京都中央区築地五丁目1番1号 国立がんセンター内

【氏名】 寺田 雅昭

【特許出願人】

【識別番号】 591038141

【氏名又は名称】 寶酒造株式会社

【特許出願人】

【識別番号】 598139461

【氏名又は名称】 国立がんセンター総長

【特許出願人】

【識別番号】 598004952

【氏名又は名称】 医薬品副作用被害救済・研究振興調査機構

【代理人】

【識別番号】 100095832

【弁理士】

【氏名又は名称】 細田 芳徳

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 050739

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 DNAの増幅方法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 最小サイズの断片化DNAに対する最大サイズの断片化DNAのサイズ比（分散比）として、1～5の分散比であり、かつ80%以上のサイズ収束率を有する断片化DNAを調製可能なDNA断片化手段により、ゲノムDNAを処理して断片化DNAを得、核酸増幅反応により該断片化DNAに対応するDNAを増幅して、ゲノム上における遺伝子群又は配列のコピー数と、該遺伝子群又は配列のゲノム上における存在比率とを保持したDNAを得ることを特徴とする、DNA増幅方法。

【請求項2】 DNA断片化手段が、物理的手法である、請求項1記載のDNA増幅方法。

【請求項3】 断片化DNAが、最小サイズの断片化DNAに対する最大サイズの断片化DNAのサイズ比（分散比）として、1～5の分散比を有するDNAの混合物である、請求項1又は2記載のDNA増幅方法。

【請求項4】 断片化DNAが、80%以上のサイズ収束率を有するDNAの混合物である、請求項1～3いずれか1項に記載のDNA増幅方法。

【請求項5】 断片化DNAが、平均サイズ0.8kbp～1.5kbpのDNAの混合物である、請求項1～4いずれか1項に記載のDNA増幅方法。

【請求項6】 物理的手法が、ハイドロダイナミック ポイントーシンク シェアリング (hydrodynamic point-sink shearing) 法である、請求項1～5いずれか1項に記載のDNA増幅方法。

【請求項7】 (a) 該DNA断片化手段により、ゲノムDNAを処理して、断片化DNAを得るステップ；

(b) 前記ステップ(a)で得られた断片化DNAに、アダプターDNAを連結し、DNA断片を得るステップ；並びに

(c) 前記ステップ(b)で得られたDNA断片を鋳型とし、増幅用プライマーを用いて核酸増幅反応を行なうステップ；

を含む、請求項1～6いずれか1項記載のDNA増幅方法。

【請求項 8】 ステップ (a) において、DNA断片化手段が、ハイドロダイナミック ポイント-シンク シェアリング (hydrodynamic point-sink shearing) 法である、請求項 7 記載の DNA 増幅方法。

【請求項 9】 核酸増幅反応が、ポリメラーゼ チェーン リアクション (PCR: Polymerase Chain Reaction) 法である、請求項 1~8 いずれか 1 項に記載の DNA 増幅方法。

【請求項 10】 核酸増幅反応において用いられる増幅用プライマーが、下記 (i) 及び (ii) :

(i) 該アダプター-DNA に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチド、  
(ii) 前記 (i) のオリゴヌクレオチドにおいて、制限酵素認識配列、リンカー配列、RNAポリメラーゼのプロモーター配列からなる群より選ばれた少なくとも 1 種をさらに含有したオリゴヌクレオチド、  
からなる群より選ばれたプライマーである、請求項 7~9 いずれか 1 項に記載の DNA 増幅方法。

【請求項 11】 ステップ (c) において、校正活性を有した DNA ポリメラーゼを用いる、請求項 7~10 いずれか 1 項に記載の DNA 増幅方法。

【請求項 12】 DNA ポリメラーゼが耐熱性 DNA ポリメラーゼである、請求項 11 記載の DNA 増幅方法。

【請求項 13】 DNA ポリメラーゼが、LA (Long and Accurate) -PCR を行なうのに適した性質を有する DNA ポリメラーゼである、請求項 11 又は 12 記載の DNA 増幅方法。

【請求項 14】 DNA ポリメラーゼが、3' → 5' エキソヌクレアーゼ活性を有する DNA ポリメラーゼと 3' → 5' エキソヌクレアーゼ活性を有さない DNA ポリメラーゼとの混合物である、請求項 11~13 いずれか 1 項に記載の DNA 増幅方法。

【請求項 15】 DNA ポリメラーゼが、3' → 5' エキソヌクレアーゼ活性を有する少なくとも 2 種の DNA ポリメラーゼの混合物である、請求項 11~14 いずれか 1 項に記載の DNA 増幅方法。

【請求項16】 DNAポリメラーゼが、 $\alpha$ 型のDNAポリメラーゼと非 $\alpha$ 非ポリI型のDNAポリメラーゼとの混合物である、請求項15記載のDNA増幅方法。

【請求項17】 ゲノムDNA上における遺伝子群又は配列のコピー数と該遺伝子群又は配列のゲノム上における存在比率とを保持してなるゲノムDNAライブラリー。

【請求項18】 請求項1～16いずれか1項に記載のDNA増幅方法により得られてなるゲノムDNAライブラリー。

【請求項19】 請求項1～16いずれか1項に記載のDNA増幅方法を行ない、ゲノムDNAライブラリーを調製するためのキットであって、下記(1)～(6)の増幅用試薬：

- (1) DNAリガーゼ、
  - (2) DNA末端を平滑化しうる酵素、
  - (3) 耐熱性DNAポリメラーゼ、
  - (4) アダプターDNA、
  - (5) PCR用試薬、並びに
  - (6) 下記(i)及び(ii)：
    - (i) 該アダプターDNAに相補的な配列を有するオリゴヌクレオチド、
    - (ii) 前記(i)のオリゴヌクレオチドにおいて、制限酵素認識配列、リンカー配列、RNAポリメラーゼのプロモーター配列からなる群より選ばれた少なくとも1種をさらに含有したオリゴヌクレオチド、
- からなる群より選ばれた増幅用プライマー、
- を含有し、かつ前記増幅用試薬を用いて、請求項1～16いずれか1項に記載のDNA増幅方法を行なう手順が指示された指示書を含有してなる、DNA増幅用キット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、増幅時において、得られたDNA断片において、ゲノム上における

遺伝子群又は配列のコピー数と、該遺伝子群又は配列のゲノム上における存在比率とが保持され、ゲノムDNAと同一の多型パターンが保持されうるDNA増幅方法に関する。

## 【0002】

## 【従来の技術】

ヒトゲノム解析により、易罹患性、疾患の発症の可能性、個人の体質等を遺伝子多型、例えば、SNP等に基づく判定が可能になると考えられている。個人の体質等に影響を及ぼす膨大な遺伝子多型のタイピングを基に、統計解析を行なう場合、ゲノムを得るための試料、例えば、血液試料等の枯渇問題が深刻となることが予想されている。

## 【0003】

また、種々の臨床情報を有するDNAの保存は、機能ゲノム解析等のゲノム科学の進歩、医学分野への応答等に備えるために不可欠であると考えられている。

## 【0004】

現在、DNAの保存技術として、当該DNAを増幅して、保存する手法等が用いられている。かかるDNAを増幅する方法としては、制限酵素で切断したDNA断片を増幅する方法、縮重プライマーによる伸長反応で増幅するDOP-PCR法等が挙げられる。

## 【0005】

制限酵素で切断したDNA断片をPCRにより増幅する方法により、部分的なゲノムDNAを増やすことに成功している [コ(M.S.H.KO)ら, Nucl. Acids Res., 18, 4293-4294 (1990); ササキ(H.Sasaki)ら, Cancer Res., 54, 5821-5823 (1994); ルシト(R.Lucito)ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95, 4487-4492 (1998)]。かかる方法によれば、多くの種類の制限酵素を使うことにより、80~90%をカバーできる可能性がある。しかしながら、PCRにおいては300bp以下の短い断片が優先的に増幅する傾向があるため、制限酵素で切断したDNA断片をPCRにより増幅する方法によれば、不均等に増幅され、ゲノムDNAとは、多型、コピー数等の点で異なる性質を有するDNAが得られるという欠点がある。



【 0 0 0 6 】

一方、縮重プライマーによる伸長反応で増幅するDOP-PCR法等が挙げられる [テレニウス(H.Telenius)ら, Genes Chromosomes Cancer, 4, 257-263 (1992); ユアン(Q.Huang) ら, Genes Chromosomes Cancer, 28, 395-403 (2000); ザン(L.Zhang) ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 5847-5851 (1992); デェットマイヤー(W.Dietmaier) ら, AM. J. Pathol., 154, 83-95 (1999)]。しかしながら、前記したように、PCRにおいては、サイクル数を増やすほど、短いDNA断片を増幅する傾向があり、さらには、大量に増幅することは困難であり、ゲノムDNAの配列によって増幅効率が異なるため、不均等な構成になるという欠点がある。

【 0 0 0 7 】

したがって、ゲノムDNAにおける本来のコピー数の量比を反映しうる増幅方法が望まれている。

【 0 0 0 8 】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の目的は、得られたDNA断片において、ゲノム上における遺伝子群又は配列のコピー数と、該遺伝子群又は配列のゲノム上における存在比率とが保持されうるDNA増幅方法を提供することにある。

【 0 0 0 9 】

【課題を解決するための手段】

即ち、本発明は、

〔1〕 最小サイズの断片化DNAに対する最大サイズの断片化DNAのサイズ比（分散比）として、1～5の分散比であり、かつ80%以上のサイズ収束率を有する断片化DNAを調製可能なDNA断片化手段により、ゲノムDNAを処理して断片化DNAを得、核酸増幅反応により該断片化DNAに対応するDNAを増幅して、ゲノム上における遺伝子群又は配列のコピー数と、該遺伝子群又は配列のゲノム上における存在比率とを保持したDNAを得ることを特徴とする、DNA増幅方法、

〔2〕 DNA断片化手段が、物理的手法である、前記〔1〕記載のDNA増幅

方法、

〔3〕 断片化DNAが、最小サイズの断片化DNAに対する最大サイズの断片化DNAのサイズ比（分散比）として、1～5の分散比を有するDNAの混合物である、前記〔1〕又は〔2〕記載のDNA増幅方法、

〔4〕 断片化DNAが、80%以上のサイズ収束率を有するDNAの混合物である、前記〔1〕～〔3〕いずれか1項に記載のDNA増幅方法、

〔5〕 断片化DNAが、平均サイズ0.8kbp～1.5kbpのDNAの混合物である、前記〔1〕～〔4〕いずれか1項に記載のDNA増幅方法、

〔6〕 物理的手法が、ハイドロダイナミック ポイントーシンク シェアリング（hydrodynamic point-sink shearing）法である、前記〔1〕～〔5〕いずれか1項に記載のDNA増幅方法、

〔7〕 （a）該DNA断片化手段により、ゲノムDNAを処理して、断片化DNAを得るステップ；

（b）前記ステップ（a）で得られた断片化DNAに、アダプターDNAを連結し、DNA断片を得るステップ；並びに

（c）前記ステップ（b）で得られたDNA断片を鋳型とし、増幅用プライマーを用いて核酸増幅反応を行なうステップ；

を含む、前記〔6〕記載のDNA増幅方法、

〔8〕 ステップ（a）において、DNA断片化手段が、ハイドロダイナミック ポイントーシンク シェアリング（hydrodynamic point-sink shearing）法である、前記〔7〕記載のDNA増幅方法、

〔9〕 核酸増幅反応が、ポリメラーゼ チェーン リアクション（PCR：Polymerase Chain Reaction）法である、前記〔1〕～

〔8〕いずれか1項に記載のDNA増幅方法、

〔10〕 核酸増幅反応において用いられる増幅用プライマーが、下記（i）及び（ii）：

（i）該アダプターDNAに相補的な配列を有するオリゴヌクレオチド、

（ii）前記（i）のオリゴヌクレオチドにおいて、制限酵素認識配列、リンカー配列、RNAポリメラーゼのプロモーター配列からなる群より選ばれた少なくとも

も1種をさらに含有したオリゴヌクレオチド、

からなる群より選ばれたプライマーである、前記〔7〕～〔9〕いずれか1項に記載のDNA増幅方法、

〔11〕 ステップ(c)において、校正活性を有したDNAポリメラーゼを用いる、前記〔7〕～〔10〕いずれか1項に記載のDNA増幅方法、

〔12〕 DNAポリメラーゼが耐熱性DNAポリメラーゼである、前記〔11〕に記載のDNA増幅方法、

〔13〕 DNAポリメラーゼが、LA(Long and Accurate)－PCRを行なうのに適した性質を有するDNAポリメラーゼである、前記〔11〕又は〔12〕に記載のDNA増幅方法、

〔14〕 DNAポリメラーゼが、3'→5'エキソヌクレアーゼ活性を有するDNAポリメラーゼと3'→5'エキソヌクレアーゼ活性を有さないDNAポリメラーゼとの混合物である、前記〔11〕～〔13〕いずれか1項に記載のDNA増幅方法、

〔15〕 DNAポリメラーゼが、3'→5'エキソヌクレアーゼ活性を有する少なくとも2種のDNAポリメラーゼの混合物である、前記〔11〕～〔14〕いずれか1項に記載のDNA増幅方法、

〔16〕 DNAポリメラーゼが、 $\alpha$ 型のDNAポリメラーゼと非 $\alpha$ 非ポリI型のDNAポリメラーゼとの混合物である、前記〔15〕に記載のDNA増幅方法、

〔17〕 ゲノムDNA上における遺伝子群又は配列のコピー数と該遺伝子群又は配列のゲノム上における存在比率とを保持してなるゲノムDNAライブラリー

〔18〕 前記〔1〕～〔16〕いずれか1項に記載のDNA増幅方法により得られてなるゲノムDNAライブラリー、並びに

〔19〕 前記〔1〕～〔16〕いずれか1項に記載のDNA増幅方法を行ない、ゲノムDNAライブラリーを調製するためのキットであって、下記(1)～(6)の増幅用試薬：

(1) DNAリガーゼ、

(2) DNA末端を平滑化しうる酵素、

(3) 耐熱性DNAポリメラーゼ、

(4) アダプターDNA、

(5) PCR用試薬、並びに

(6) 下記 (i) 及び (ii) :

(i) 該アダプターDNAに相補的な配列を有するオリゴヌクレオチド、

(ii) 前記 (i) のオリゴヌクレオチドにおいて、制限酵素認識配列、リンカー配列、RNAポリメラーゼのプロモーター配列からなる群より選ばれた少なくとも1種をさらに含有したオリゴヌクレオチド、

からなる群より選ばれた増幅用プライマー、

を含有し、かつ前記増幅用試薬を用いて、前記〔1〕～〔16〕いずれか1項に記載のDNA増幅方法を行なう手順が指示された指示書を含有してなる、DNA増幅用キット、

に関する。

【0010】

【発明の実施の形態】

本発明は、ゲノムDNAを、特定のパフォーマンスを発揮するDNA断片化手段により処理して断片化DNAを得、核酸増幅反応により該断片化DNAに対応するDNAを増幅することにより、増幅されたDNAが、ゲノム上における遺伝子群又は配列のコピー数と、該遺伝子群又は配列のゲノム上における存在比率とを保持するという本発明者らの驚くべき知見に基づく。

【0011】

すなわち、本発明のDNA増幅方法は、最小サイズの断片化DNAに対する最大サイズの断片化DNAのサイズ比（分散比）として、1～5の分散比であり、かつ80%以上のサイズ収束率を有する断片化DNAを調製可能なDNA断片化手段により、ゲノムDNAを処理して断片化DNAを得、核酸増幅反応により該断片化DNAに対応するDNAを増幅して、ゲノム上における遺伝子群又は配列のコピー数と、該遺伝子群又は配列のゲノム上における存在比率とを保持したDNAを得ることに1つの大きな特徴がある。

【0012】

本発明のDNA増幅方法によれば、前記DNA断片化手段によりDNAを処理して断片化DNAを得るため、短いDNA断片由来の断片の増幅への偏りおよび不均等な増幅を抑制することができるという優れた効果を発揮する。また、本発明のDNA増幅方法によれば、ゲノムDNAにおけるコピー数の量比、該ゲノムDNAにおける遺伝子群又は配列のゲノム上における存在比率、該ゲノムDNAと同一の多型パターンなどが保持されたDNAを大量に増幅することができるという優れた効果を発揮する。

【0013】

なお、本発明のDNA増幅方法により得られるゲノムDNAライブラリーを「ゲノムDNA不死化ライブラリー」と称する場合もある。

【0014】

また、本明細書において「断片化DNA」の語は、特に断りのない限り、数種類のDNA断片の混合物を意味する。

【0015】

本発明のDNA増幅方法においては、ゲノムDNAにおけるコピー数の量比及び該ゲノムDNAと同一の多型パターンを保持する増幅DNAを得る観点から、断片化DNAとしては、最小サイズの断片化DNAに対する最大サイズの断片化DNAのサイズ比（分散比）として、5以下の分散比を有するDNAの混合物が挙げられる。具体的には、断片化DNAは、1～5の分散比を有するDNAの混合物である。

【0016】

前記分散比は、例えば、

- ① 断片化DNAを、慣用の核酸検出手段に供し、
  - ② 最大サイズのDNA及び最小サイズのDNAそれぞれのサイズを測定し、
  - ③ 最小サイズの断片化DNAに対する最大サイズの断片化DNAの比を算出する
- ことにより評価されうる。

【0017】

前記①の核酸検出手段としては、例えば、アガロースゲル電気泳動、ポリアク

リルアミドゲル電気泳動、HPLCなどが挙げられる。

【0018】

前記②において、DNAのサイズの測定は、例えば、慣用の分子量マーカーなどを対照として用いて、断片化DNAの移動度、質量などを評価することにより行なわれうる。

【0019】

また、前記①において、アガロースゲル電気泳動、ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行なう場合、前記②において、任意に、DNAに由来するバンドを可視化してもよい。DNAに由来するバンドを可視化する手段としては、特に限定はされないが、インターカレーター型の蛍光物質等が好適に使用でき、例えば、エチジウムブロマイド、サイバーグリーン、サイバーゴールド、アクリジン、ステインオールなどが挙げられる。

【0020】

また、前記①において、HPLCを行なう場合、前記②と同時に行なうことができる。

【0021】

また、慣用のゲル濾過法を組み合わせたHPLCにより分析することもできる。

【0022】

本発明のDNA増幅方法においては、ゲノムDNAにおけるコピー数の量比及び該ゲノムDNAと同一の多型パターンを保持する増幅DNAを得る観点から、断片化DNAは、0.8kbp以上、好ましくは、0.8kbp以上、より好ましくは、0.5kbp以上の平均サイズのDNAの混合物であり、同様の観点から、2.5kbp以下、好ましくは、1.5kbp以下の平均サイズのDNAの混合物である。

【0023】

DNAの平均サイズは、断片化DNAを、アガロースゲル電気泳動、ポリアクリルアミドゲル電気泳動などに供し、ゲル上のDNAを可視化し、さらに、デンストメーター、イメージスキャナーなどにより、ゲル上におけるバンドの強度を

読み取ることにより、各サイズのDNA量などを測定し、ついで、前記DNA量とDNAのサイズとに基づき、平均値を算出することにより評価されうる。

## 【0024】

また、本発明のDNA増幅方法においては、ゲノムDNAにおけるコピー数の量比及び該ゲノムDNAと同一の多型パターンを保持する増幅DNAを得る観点から、断片化DNAは、80%以上、好ましくは、85%以上、より好ましくは、90%以上のサイズ収束率のDNAの混合物である。なお、本明細書において、サイズ収束率とは、所望する大きさのDNA断片を中心とした2-fold size distributions の調製DNA断片全体に占める割合を意味する。

## 【0025】

かかる断片化DNAを得る観点から、DNA断片化手段としては、物理的手法が挙げられる。前記物理的手法としては、具体的には、最小サイズの断片化DNAに対する最大サイズの断片化DNAのサイズ比（分散比）として、1～5の分散比であり、かつ80%以上のサイズ収束率を有する断片化DNAを調製可能である物理的手法が挙げられる。

## 【0026】

前記物理的手法としては、より具体的には、ハイドロダイナミック ポイントーシンク シェアリング (hydrodynamic point-sink shearing) 法 [ペーター (Peter J. Oefner) ら, Nucleic Acids Res., 24, 3879-3886 (1996); イボンヌ (Yvonne R. Thorstenson) ら, Genome Research, 8, 848-855 (1998); 米国特許第5, 846, 832号明細書] などが挙げられる。本発明のDNA増幅方法においては、前記分散比、サイズ収束率及び平均サイズを満たす断片化DNAを効率よく得る観点から、ハイドロダイナミック ポイントーシンク シェアリング法が好適である。前記ハイドロダイナミック ポイントーシンク シェアリング法とは、DNA溶液を、途中で急激に幅が狭まった領域（狭小領域ともいう）を含む管構造を有するチューブに通して、前記管構造中における狭小領域を介して該溶液の体積流速を増大させ、それにより、生じた抵抗によりDNAを断片化する技術である。かかるハイドロダイナミック ポイントーシンク シェアリング法によれば、溶液の流速及び狭小領域のサイズを

調節することにより、最終DNA断片サイズを決定することができる。

【0027】

なお、本発明のDNA増幅方法において前記物理的手法のかわりに、前記分散比、サイズ収束率及び平均サイズを満たす断片化DNAを得ることができる他の手法を適用した場合も本発明の範囲に含まれる。

【0028】

本発明のDNA増幅方法としては、具体的には、下記ステップ(a)～(c)

:

(a) 前記DNA断片化手段により、ゲノムDNAを処理して、断片化DNAを得るステップ；

(b) 前記ステップ(a)で得られた断片化DNAに、アダプターDNAを連結させて、DNA断片を得るステップ；並びに

(c) 前記ステップ(b)で得られたDNA断片を鋳型とし、増幅用プライマーを用いて核酸増幅反応を行なうステップ；  
を含む方法が挙げられる。

【0029】

まず、前記DNA断片化手段により、ゲノムDNAを処理する〔ステップ(a)という〕。

【0030】

本発明のDNA増幅方法を適用しうるゲノムDNAは、いかなるゲノムDNAであってもよい。かかるゲノムDNAは、慣用の手法、例えば、界面活性剤による細胞、組織などの溶解処理、音波処理、ガラスビーズを用いた振盪攪拌又はフレンチプレスによる破碎；フェノール抽出；各種クロマトグラフィー；イオン交換；ゲル電気泳動；密度に依存した遠心分離などを含む一連の操作により、細胞、組織などの生体由来試料、ウイロイド、ウイルス、細菌、カビ、酵母、植物及び動物のような核酸含有試料などから調製されうる。

【0031】

なお、前記ステップ(a)において得られた断片化DNAについて、任意に、エタノール沈澱；マイクロフィルターなどによる脱塩・濃縮操作などを行なって



もよい。

【0032】

ついで、ステップ（a）で得られた断片化DNAに、核酸増幅反応に用いるのに適した配列を有するアダプターDNAを連結させる〔ステップ（b）という〕。

【0033】

前記アダプターDNAとしては、核酸増幅反応において、該アダプターDNA中に存在する配列に基づき特異的増幅を行なうに適したDNAであればよく、例えば、増幅対象となるゲノムDNAにおいて存在しないか、若しくは存在頻度が低い配列を有するDNAなどが挙げられる。また、かかるDNAは、核酸の増幅反応に使用できるものであれば特に限定はなく、例えば、PCR、より好ましくは、LA（Long and Accurate）-PCRを行なうに適したプライマーを作製しうる配列であることがより好適である。

【0034】

さらに、前記アダプターDNAは、その内部に適当な制限酵素の認識配列を有していてもよい。

【0035】

前記アダプターDNAの末端の形状は、ライゲーション反応の効率性の観点から、平滑末端であることが望ましい。かかる末端の形状としては、例えば、SmaI、NruI、PvuII、EcoRV、ScaI等の制限酵素処理によって生じるような平滑末端型などが挙げられる。

【0036】

前記アダプターDNAの長さは、PCRの特異性の観点から、20bp以上であることが望ましい。

【0037】

本発明の方法に使用されるアダプターDNAは、任意の核酸配列を持つように、例えば、ホスホアミダイト法、リン酸トリエステル法、H-ホスホネート法、チオホスホネート法などの慣用の合成方法などにより合成されたものであってもよい。

【0038】

かかるアダプターDNAは、市販品であってもよい。前記市販品としては、例えば、EcoRI-NotI-BamHIアダプター（宝酒造社製）などが挙げられるが、本発明はかかる例示により限定されるものではない。

【0039】

また、ステップ（b）においては、ステップ（a）で得られた断片化DNAとアダプターDNAとの連結に先立ち、該断片化DNAの末端修復処理を任意に行なってもよい。

【0040】

前記末端修復処理は、例えば、T4 DNAポリメラーゼ、クレノウ フラグメント（Klenow Fragment）、S1ヌクレアーゼ、マング ビーンヌクレアーゼ（Mung Bean Nuclease）などを用いて行なうことができる。

【0041】

前記断片化DNAとアダプターDNAとの連結には、常温性DNAリガーゼ、例えば、T4 DNAリガーゼ、大腸菌DNAリガーゼを用いることができる。また、耐熱性のDNAリガーゼ、超耐熱性リガーゼなどをも用いることができる。

【0042】

なお、かかるステップ（b）において得られたDNA断片について、任意に、エタノール沈澱；マイクロフィルターなどによる脱塩・濃縮操作などを行なってもよい。

【0043】

ついで、前記ステップ（b）で得られたDNA断片を鋳型とし、増幅用プライマーを用いて核酸増幅反応を行なう〔ステップ（c）という〕。

【0044】

ステップ（c）において、核酸増幅反応に適した量の前記DNA断片を鋳型として用いることができる。

【0045】

前記核酸増幅反応としては、PCR法などの慣用の核酸増幅法が挙げられる。なかでも、ゲノム上における遺伝子群又は配列のコピー数と、該遺伝子群又は配列のゲノム上における存在比率とをより良好に保持する観点から、LA技術に基づくPCR法、すなわちLA-PCR法が望ましい。また、PCRは、二本鎖鋳型DNAの一本鎖への解離（変性）、一本鎖鋳型DNAへのプライマーのアニーリング、プライマーからの相補鎖合成（伸長）の3つのステップによるDNAの増幅であってもよく、“シャトルPCR”（『PCR法最前線』、「蛋白質 核酸 酵素」別冊、第41巻、第5号、425頁～428頁（1996））と呼ばれるプライマーのアニーリングおよび伸長のステップを同一温度で行なう2ステップによるDNAの増幅であってもよい。

## 【0046】

PCR法により、核酸増幅反応を行なう場合、DNAポリメラーゼとしては、PCR法に用いられる慣用のDNAポリメラーゼであればよく、ゲノム上における遺伝子群又は配列のコピー数と、該遺伝子群又は配列のゲノム上における存在比率とをより良好に保持する観点から、校正活性（3' → 5' プルーフリーディング活性）を有するDNAポリメラーゼが好ましい。

## 【0047】

さらに、ゲノムDNAにおける2次構造、GC含量の差などによる増幅の不均衡化を抑制し、ゲノム上における遺伝子群又は配列のコピー数と、該遺伝子群又は配列のゲノム上における存在比率とをより良好に保持する観点から、前記DNAポリメラーゼは、耐熱性DNAポリメラーゼがより好ましい。また、ゲノム上における配列情報の保持の観点、ゲノム上における遺伝子群又は配列のコピー数と、該遺伝子群又は配列のゲノム上における存在比率とをより良好に保持する観点から、LA（Long and Accurate）-PCRを行なうのに適した性質を有するDNAポリメラーゼがさらに好ましい。

## 【0048】

かかるDNAポリメラーゼとしては、α型のDNAポリメラーゼ、混合型DNAポリメラーゼなどが挙げられる。

## 【0049】

ここで、「3' → 5' エキソヌクレアーゼ活性を実質的に有しない他のDNAポリメラーゼ」は、天然由来の3' → 5' エキソヌクレアーゼ活性を持たないDNAポリメラーゼ又は人為的に3' → 5' エキソヌクレアーゼ活性発現に關与する機能部分を改変することにより該活性を発現しないDNAポリメラーゼを包含する。

## 【0050】

前記α型DNAポリメラーゼとしては、より具体的には、ピロコッカス フリオサス由来α型DNAポリメラーゼ（例えば、Pfu DNAポリメラーゼなど）、サーモコッカス リトラリス(Thermococcus litralis) 由来DNAポリメラーゼ（VENT DNAポリメラーゼ）、ピロコッカス sp. KOD1 (Pyrococcus sp. KOD1)由来DNAポリメラーゼ（KOD DNAポリメラーゼ）、ピロコッカス sp. GB-D (Pyrococcus sp. GB-D)由来DNAポリメラーゼ（DEEP VENT DNAポリメラーゼ）などが挙げられる。かかるα型DNAポリメラーゼは、市販の酵素であってもよく、例えば、PyroBEST DNAポリメラーゼ（宝酒造社製）、KOD DNAポリメラーゼ（東洋紡社製）、Vent DNAポリメラーゼ〔ニューイングランドバイオラボ（New England Biolab）社製〕、Deep Vent DNAポリメラーゼ（ニューイングランドバイオラボ社製）、Tli DNAポリメラーゼ（プロメガ社製）、Pwo DNAポリメラーゼ（ベーリンガー社製）、Pfu turbo DNAポリメラーゼ（ストラタジーン社製）などが挙げられる。

## 【0051】

前記混合型DNAポリメラーゼとは、異なる性質を有する少なくとも2種のDNAポリメラーゼの混合物をいい、具体的には、例えば、3' → 5' エキソヌクレアーゼ活性を有するDNAポリメラーゼと3' → 5' エキソヌクレアーゼ活性を実質的に有さない他のDNAポリメラーゼとの混合物；3' → 5' エキソヌクレアーゼ活性を有する少なくとも2種のDNAポリメラーゼの混合物；α型のDNAポリメラーゼと非α非ボルI型のDNAポリメラーゼとの混合物が挙げられる。かかる混合型DNAポリメラーゼは、市販の酵素であってもよく、例えば、タカラ Ex タック（宝酒造社製）、タカラ LA タック（宝酒造社製）、

KOD dash (東洋紡社製)、rTth DNAポリメラーゼXL (パーキン・エルマー社製)、TaqPlus DNAポリメラーゼ (ストラタジーン社製)、Expand High Fidelity PCRシステム (ロシュ社製)、Advantage-HF DNAポリメラーゼ (クローンテック社製) などが挙げられる。

【0052】

核酸増幅反応において用いられる増幅用プライマーとしては、アダプターDNAに実質的に相補的な塩基配列を有するプライマー又は該アダプターDNAに内在する塩基配列を有するプライマーであって、かつそれらの3'末端よりDNA鎖の伸長が可能であるプライマーであればよい。

【0053】

なお、ここで「実質的に相補的な塩基配列」とは、使用される反応条件、例えばラボマニュアルPCR (宝酒造、第13頁～第17頁、1996年) に記載のT<sub>m</sub>値を指標にしたストリンジェントな条件においてアダプターDNAにアニーリングし、続くDNA伸長反応が可能な塩基配列を意味する。このようなプライマーの設計は、当業者に公知であり、例えば、ラボマニュアルPCR (宝酒造株式会社発行、第13頁～第16頁、1996年) を参考に設計することができる。また、市販のプライマー構築ソフト、例えば、OLIGO<sup>TM</sup>Primer Analysis software (宝酒造社製) を使用することができる。

【0054】

また、前記増幅用プライマーは、本発明のDNA増幅方法により得られるゲノムDNAライブラリーの使用目的などに応じて、その5'側に、アダプターDNAの塩基配列と相補性のない修飾配列、例えば、制限酵素認識配列、リンカー配列、RNAポリメラーゼのプロモーター配列などを付加したオリゴヌクレオチドであってもよい。

【0055】

前記RNAポリメラーゼのプロモーター配列としては、例えば、SP6 RNAポリメラーゼのプロモーター配列、T7 RNAポリメラーゼのプロモーター配列、T3 RNAポリメラーゼのプロモーター配列等が挙げられる。

【 0 0 5 6 】

本発明の方法において使用される増幅用プライマーは、アダプターDNAに対する特異性を保持し、それにより、ゲノム上における遺伝子群又は配列のコピー数と、該遺伝子群又は配列のゲノム上における存在比率とをより良好に保持する観点から、15塩基長以上、好ましくは、20塩基長以上であり、増幅反応効率の観点から、アダプターDNAの全長未満の塩基長であり、50塩基長以下、好ましくは、30塩基長以下であることが望ましい。かかるプライマーの配列は、3'末端側がストリンジェントな条件においてアニーリングするように、好ましくは、実質的にアダプターDNAに相同であることが望ましい。

【 0 0 5 7 】

増幅用プライマーとしては、具体的には、下記 (i) 及び (ii) :

- (i) 該アダプターDNAに相補的な配列を有するオリゴヌクレオチド、
  - (ii) 前記 (i) のオリゴヌクレオチドに、制限酵素認識配列、リンカー配列、RNAポリメラーゼのプロモーター配列からなる群より選ばれた少なくとも1種をさらに付加されてなるオリゴヌクレオチド、
- からなる群より選ばれたプライマーが挙げられる。

【 0 0 5 8 】

本発明の方法に使用される増幅用プライマーは、任意の核酸配列を持つように、例えば、ホスホアミダイト法、リン酸トリエステル法、H-ホスホネート法、チオホスホネート法などの慣用の合成方法などにより得られる。

【 0 0 5 9 】

本発明のDNA増幅方法においては、核酸増幅反応における反応条件は、用いるDNAポリメラーゼ、核酸増幅法などにより適宜設定することができる。

【 0 0 6 0 】

得られたゲノムDNAライブラリーは、適切な宿主に導入可能な適切なベクターに連結してもよい。また、使用目的に応じて、核酸増幅反応の際に、標識されたデオキシヌクレオチドを使用して、標識化ゲノムDNAライブラリーを得ることもできる。かかるベクターとしては、例えば、宿主が大腸菌である場合、プラスミドベクターとして、pUC18、pUC19、pBlueScript、p

ET、pGEMなどが挙げられ、ファージベクターとして、 $\lambda$ gt10、 $\lambda$ gt11などのラムダファージベクターなどが挙げられる。

【0061】

本発明のDNA増幅方法によれば、ゲノム上における遺伝子群又は配列のコピー数と、該遺伝子群又は配列のゲノム上における存在比率とを保持するDNAを得ることができるため、例えば、遺伝子多型の解析、疾患に関する遺伝子診断、DNAアレイの作製、ゲノム解析などに伴うオープンリーディングフレームの検索のための試料の調製、稀少生物の遺伝子保存、変異解析、塩基配列解析、サザンブロット解析などにおいて有用である。

【0062】

ゲノムDNA上における遺伝子群又は配列のコピー数と該遺伝子群又は配列のゲノム上における存在比率とを保持したゲノムDNAライブラリーは、従来の多種の制限酵素を用いるライブラリー作製技術では、作製が困難な場合が多いが、本発明のDNA合成方法により、容易に作製できるようになるものである。かかるゲノムDNAライブラリーも本発明の範囲に含まれる。

【0063】

本発明のゲノムDNAライブラリーは、ゲノムDNA上における遺伝子群又は配列のコピー数と該遺伝子群又は配列のゲノム上における存在比率とを保持することに1つの特徴がある。本発明のゲノムDNAライブラリーは、遺伝子多型の解析、疾患に関する遺伝子診断、DNAアレイの作製、ゲノム解析などに伴うオープンリーディングフレームの検索のための試料、稀少生物の遺伝子保存、遺伝子標本、変異解析、塩基配列解析、サザンブロット解析などにおいて有用である。

【0064】

かかるゲノムDNAライブラリーは、前記DNA増幅方法により得られうる。

【0065】

本発明のゲノムDNAライブラリーは、さらに、使用目的により、例えば、調製する際に、標識されたデオキシヌクレオチドを使用して得られた標識化ゲノムDNAライブラリーであってもよく、遺伝子のクローン化などを容易に行なうこ

とができるように適切なベクターに連結して得られたゲノムDNAライブラリーであってもよい。かかるゲノムDNAライブラリーも本発明の範囲に含まれる。

## 【0066】

ゲノムDNAライブラリーにおいて、ゲノム上における遺伝子群又は配列のコピー数を保持しているか否かは、例えば、下記のように調べる。すなわち、ゲノムDNAとゲノムDNAライブラリーとについて、1) 数種類の同一遺伝子に対応する同量(同じ放射比活性)の標識プローブを用いて、サザンブロット解析、スロットブロット解析などのハイブリダイゼーション解析を行ない、2) ハイブリダイズした標識プローブに由来するシグナル強度を比較し、同等であるかどうかを評価する。ゲノムDNAとゲノムDNAライブラリーとの間で遺伝子群又は配列のコピー数が同一である場合には、シグナル強度は実質的に同等になる。

## 【0067】

また、ゲノムDNAライブラリーにおいて、遺伝子群又は配列のゲノム上における存在比率を保持しているか否かは、例えば、下記のように調べる。すなわち、1') ゲノムDNAとゲノムDNAライブラリーとについて、遺伝子群又は配列を特異的に増幅することができるプライマーを用いてPCRを行ない、2') それぞれの産物をアガロースゲル電気泳動に供して、それぞれの増幅パターンが同じであるかどうかを評価する。ゲノムDNAとゲノムDNAライブラリーとの間で遺伝子群又は配列の遺伝子群又は配列のゲノム上における存在比率が同じである場合、電気泳動による増幅パターンは実質的に同一になる。

## 【0068】

本発明のゲノムDNAライブラリーは、通常のサザンハイブリダイゼーション法、ドットハイブリダイゼーション法、ノーザンハイブリダイゼーション法; 及びメンブレン等のマクロアレイあるいはDNAマイクロアレイを用いたハイブリダイゼーション法などにおいても好適に使用されうる。

## 【0069】

また、本発明のDNA増幅方法は、下記(1)～(6)の増幅用試薬:

- (1) DNAリガーゼ、
- (2) DNA末端を平滑化する酵素、



(3) 耐熱性DNAポリメラーゼ、

(4) アダプターDNA、

(5) PCR用試薬、及び

(6) 下記(i)及び(ii)：

(i) 該アダプターDNAに相補的な配列を有するオリゴヌクレオチド、

(ii) 前記(i)のオリゴヌクレオチドにおいて、制限酵素認識配列、リンカー配列、RNAポリメラーゼのプロモーター配列からなる群より選ばれた少なくとも1種をさらに含有したオリゴヌクレオチド、

からなる群より選ばれた増幅用プライマー、

を含有し、かつ前記増幅用試薬を用いて、本発明のDNA増幅方法を行なう手順が指示された指示書を含有した、本発明のDNA増幅方法を行ない、ゲノムDNAライブラリーを調製するためのDNA増幅用キットにより、より簡便かつ迅速に行なわれうる。かかるDNA増幅用キットも本発明の範囲に含まれる。

【0070】

前記(1)のDNAリガーゼとしては、前記DNA増幅方法において例示されたものと同様のDNAリガーゼが挙げられる。

【0071】

前記(2)のDNA末端を平滑化する酵素としては、前記DNA増幅方法における末端修復処理において列挙された各種酵素が挙げられる。

【0072】

前記(3)の耐熱性DNAポリメラーゼ及び前記(4)のアダプターDNAとしては、前記DNA増幅方法において例示されたものと同様のDNAポリメラーゼ及びアダプターDNAが挙げられる。

【0073】

前記(5)のPCR用試薬としては、dNTPs混合物、塩化マグネシウム、前記(3)の耐熱性DNAポリメラーゼに適した反応用緩衝液などが挙げられる。

【0074】

前記(6)の増幅用プライマーとしては、前記DNA増幅方法において例示さ

れたものと同様のオリゴヌクレオチドが挙げられる。

【0075】

前記指示書には、前記増幅用試薬を用いて、本発明のDNA増幅方法を行なう手順が指示されており、前記増幅用試薬を用いて、指示された手順で前記DNA増幅方法を行なうことにより、ゲノムDNA上における遺伝子群又は配列のコピー数と該遺伝子群又は配列のゲノム上における存在比率とを保持したゲノムDNAライブラリーが得られることが表示されている。

【0076】

前記指示書は、当該キットの使用方法、例えば上記ライブラリー調製用試薬の調製方法、推奨される反応条件等を記載した印刷物であり、パンフレット又はリーフレット形式の取り扱い説明書の他、キットに添付されたラベル、キットが納められたパッケージ等に記載されたものを含む。

【0077】

さらに、FD、MO、CD-ROMなどのコンピューター可読記録媒体を通して、開示、提供された情報も含まれる。ライブラリー調製用試薬の調製に関して、前記増幅用試薬それぞれの使用条件を指示した指示書が添付されたキットあるいはインターネットのような電子媒体を通して、本発明の方法が開示、提供されているキットも本発明のキットに包含される。

【0078】

本発明のDNA増幅用キットには、さらに、滅菌水、TE緩衝液などの種々の試薬を含有してもよい。

【0079】

【実施例】

実施例1

(1) ゲノムDNAの断片化

慣用の核酸抽出法〔SDS-フェノール・クロロホルム法〕により、胃癌セルラインMKN74のゲノムDNAおよび食道扁平上皮癌セルラインTE6のゲノムDNAのそれぞれを抽出した。得られたゲノムDNAそれぞれ2 $\mu$ gを200 $\mu$ lのTE緩衝液に溶解し、DNA溶液を得た。このDNA溶液を、ランダムD

NA断片化装置であるハイドロシェアー（ジェノミックインスツルメンテーションサービス社製）を用いて断片化（シェアリングスピード：5）し、 $190\mu\text{l}$ を回収した。得られた回収物に、TE緩衝液 $10\mu\text{l}$ を添加して、DNA溶液 $200\mu\text{l}$ を得た。このDNA溶液に $200\mu\text{l}$ の水飽和フェノール溶液を添加し、攪拌した後、遠心分離により上清を回収した。得られた回収物に、 $200\mu\text{l}$ のクロロホルムを添加し、攪拌した後、遠心分離により上清を回収した。さらに、得られた上清を、イソプロパノール沈殿に供し、得られた沈殿物を70%エタノールでリンスし、乾燥した。得られたペレットを、 $20\mu\text{l}$ のTE緩衝液に溶解し、断片化DNA溶液を得た。

## 【0080】

## (2) 断片化DNAの平滑末端化-1

前記(1)で得られた断片化DNA溶液 $5\mu\text{l}$ に、 $10\mu\text{l}$ のBAL31ヌクレアーゼ反応用緩衝液と $35\mu\text{l}$ の滅菌水を添加し、 $70^{\circ}\text{C}$ で5分間インキュベーション後、 $30^{\circ}\text{C}$ で5分間インキュベーションした。ついで、 $1.5\text{U}$ のBAL31ヌクレアーゼ（宝酒造社製）を添加し、 $30^{\circ}\text{C}$ で1分間インキュベーションした。得られた反応液に $50\mu\text{l}$ のTE緩衝液を添加した。得られた溶液に、 $100\mu\text{l}$ の水飽和フェノール溶液 $100\mu\text{l}$ を添加し、攪拌した後、遠心分離により上清を回収した。得られた回収物に、 $100\mu\text{l}$ のクロロホルムを添加し、攪拌した後、遠心分離により上清を回収した。得られた上清を、エタノール沈殿に供し、沈殿物を70%エタノールでリンスし、乾燥した。得られたペレットを、 $9\mu\text{l}$ の滅菌水に溶解し、BALヌクレアーゼ処理DNA溶液を得た。

## 【0081】

## (3) 断片化DNAの平滑末端化-2

前記(2)で得られたBAL31ヌクレアーゼ処理DNA溶液 $9\mu\text{l}$ について、DNAブランディングキット（宝酒造社製）を用いて、DNA末端平滑処理を行なった。得られた反応液 $10\mu\text{l}$ に、 $90\mu\text{l}$ のTE緩衝液を添加した。得られた溶液に、 $100\mu\text{l}$ の水飽和フェノール溶液を添加し、攪拌した後、遠心分離により上清を回収した。得られた上清に、 $100\mu\text{l}$ のクロロホルムを添加し、攪拌した後、遠心分離により上清を回収した。得られた上清を、イソプロパノ

ール沈殿に供した。得られた沈殿物を70%エタノールでリンスし、乾燥した。  
得られたペレットを、25  $\mu$ lのTE緩衝液に溶解した。

【0082】

(4) アダプターライゲーション

前記(3)で得られた平滑末端処理済DNA 1  $\mu$ l (約0.015  $\mu$ g相当)に、EcoRI-NotI-BamHIアダプター(宝酒造社製) 500 pmolと、2  $\mu$ lの10×ライゲーションバッファーと、T4 DNAリガーゼ(宝酒造社製) 350 Uと、1  $\mu$ lの10 mM ATPとを添加し、滅菌水で20  $\mu$ lにメスアップした。ついで得られた溶液を15℃で16時間インキュベーションすることにより、アダプターライゲーションを行なった。

【0083】

(5) 1st PCR

前記(4)におけるアダプターライゲーション後のDNA溶液 1  $\mu$ lに、配列番号: 1に記載のER1プライマー 100 pmolと、10  $\mu$ lの2.5 mM dNTPミックスと、5 UのタカラEx タック DNAポリメラーゼ(宝酒造社製)と、10  $\mu$ lの10×PCR用緩衝液を添加し、滅菌水により液量を100  $\mu$ lにした。得られた溶液の入った反応チューブをTaKaRa PCR Thermal Cycler MP(宝酒造社製)にセットし、以下の条件:

95℃、5分保持、

95℃、1分-72℃、3分を1サイクルとした15サイクル、

72℃、10分保持

でPCRを行なった。

【0084】

(6) 2nd PCR

前記(5)における1st PCR後の反応液 20  $\mu$ lに、ER1プライマー 100 pmolと、10  $\mu$ lの2.5 mM dNTPミックスと、5 UのタカラEx タック DNAポリメラーゼと、10  $\mu$ lの10×PCR用緩衝液とを添加し、滅菌水により液量を100  $\mu$ lにした。得られた溶液の入った反応チューブをTaKaRa PCR Thermal Cycler MPにセットし、

以下の条件：

95℃、5分保持、

95℃、1分－72℃、3分を1サイクルとした5サイクル、

72℃、10分保持

でPCRを行なった。

【0085】

2nd PCR後、得られた反応液100 $\mu$ lをイソプロパノール沈殿に供し、沈殿物を70%エタノールでリンスし、乾燥した。得られたペレットを、20 $\mu$ lのTE緩衝液に溶解し、ゲノムDNA不死化ライブラリーとした。

【0086】

(7) APC遺伝子の増幅確認

前記(6)で得られた上記ゲノムDNA不死化ライブラリーを鋳型に、配列番号：2～19に記載の塩基配列を有するプライマーを用いて、PCR法により、癌抑制遺伝子APCの9種類のDNA断片を増幅した。各プライマーの組み合わせと予測される増幅断片長(表中、推定増幅断片長と表記する)とを表1に示す。

【0087】

【表1】

プライマーの組合せ (配列番号)	予測増幅断片長 (bp)
2、3	303
4、5	295
6、7	301
8、9	327
10、11	399
12、13	649
14、15	1038
16、17	1372
18、19	1408

【0088】

PCRは、以下の条件：

94℃、10秒－56℃、20秒－72℃、30秒を1サイクルとする40サ

## イクル反応

72℃、3分保持  
で行なった。

### 【0089】

得られた反応液のうち、5  $\mu$  l をアガロース電気泳動に供し、増幅産物の確認を行なった。その結果、予測されたサイズのDNA断片が得られた。したがって、本方法により増幅されたゲノムDNAは、元のゲノムDNAの配列を損なうことなく増幅されていることを確認した。また、本発明の方法により、元のゲノムDNA量1  $\mu$  g からゲノムDNA不死化ライブラリーを10 mg 以上調製することができた。

### 【0090】

## 実施例 2

実施例 1 記載のゲノムDNA不死化法について検討した。

### 【0091】

(1) マイクロサテライトマーカーを対象とした本発明のゲノムDNAの不死化法の検討

本発明の方法により、増幅の際、得られる増幅断片が不均等化されていないかどうかを検討した。インフォームドコンセントのもとに得られた食道粘膜検体より、常法にてゲノムDNAを調製した。得られたゲノムDNAを用い、実施例 1 の方法によりゲノムDNA不死化ライブラリーを調製した。

### 【0092】

得られたゲノムDNA不死化ライブラリーを鋳型に、Human Map Pair (Human Screening Set, Ver-9a labeled (ABI dye; リサーチ ジェネティクス社製) を用いて、D4S1535、D3S1292、D2S337、D3S3038、D2S123、D5S346、D17S250 及び BAT23 の各マイクロサテライトマーカーをPCR増幅した。得られた増幅産物を、ジェネティックアナライザーABI PRISM 310 (PEバイオシステムズ社製) にて解析を行なった。

### 【0093】

さらに、各PCR増幅産物をRandom Primer DNA Labeling Kit（宝酒造社製）で<sup>32</sup>P標識し、6%の変性ポリアクリルアミドゲルで電気泳動した。その結果を図1に結果を示す。図1において、Oは元のゲノムDNA、Aは本発明のゲノムDNA不死化ライブラリーの場合を示す。

## 【0094】

図1に示すように、元のゲノムDNAの増幅パターンと本発明の方法により得られた増幅断片とは、同じ解析パターンであることが確認されたので、本発明の方法で得られたゲノムDNA不死化ライブラリーは、元のゲノムDNAと同じパターンを有することがわかる。すなわち、ゲノムDNA不死化ライブラリーにおいて、遺伝子群のゲノム上における存在比率が保持されていることがわかる。

## 【0095】

## (2) 本発明の方法で得られたゲノムDNA不死化ライブラリー

本発明の方法で得られたゲノムDNA不死化ライブラリーと、元の鋳型ゲノムDNAとにおける各遺伝子のコピー数について検討した。

## 【0096】

インフォームドコンセントのもと、得られた胎盤検体（C1）、正常食道粘膜検体（C2）および食道がん細胞株（TE6）のそれぞれより、常法にてゲノムDNAを調製し、実施例1の方法でゲノムDNA不死化ライブラリーを調製した。

## 【0097】

得られたゲノムDNA不死化ライブラリーから、450ng、150ng又は50ngのDNAを、コンバーチブルろ過装置（ライフテック社製）を用いて、メンブレンフィルター ハイボンド-N<sup>+</sup>（アマシャム・ファルマシア社製）にスロットブロットして、ブロットメンブランを得た。また、対照として、上記3種類のゲノムDNA10μgをEcoRI 50U（宝酒造社製）で消化して得られた産物を1%アガロースゲルで電気泳動し、メンブレンフィルター ハイボンド-N<sup>+</sup>（アマシャム・ファルマシア社製）に転写して、対照用メンブランを得た。

## 【0098】

なお、ハイブリダイゼーション解析における対象の遺伝子として、CAB1 遺伝子（ジーンバンク登録番号：D38255）、cyclin D1 遺伝子（ジーンバンク登録番号：M64349）、cyclin E1 遺伝子（ジーンバンク登録番号：M73812）、p16 遺伝子（ジーンバンク登録番号：L27211）を選択した。

## 【0099】

まず、配列番号：20～27に記載の塩基配列を有する各プライマーを用いてPCRを行なった。得られた増幅断片を精製後、得られた精製物を、常法により、プラスミドベクターpT7Blue-T（ノバジェン社製）にライゲーションした。得られたプラスミドを、ハイブリダイゼーション解析におけるプローブとして使用した。

## 【0100】

すなわち、各遺伝子の全長がクローニングされたプラスミド20ngを、Random Primer DNA Labeling Kit（宝酒造社製）を用いて、取り扱い説明書に従い、<sup>32</sup>P 標識したプローブを調製し、使用した。

## 【0101】

プローブを、下記組成：50% ホルムアミド（ナカライ・テスク社製）、5×SSC〔1×SSCの組成：0.15M NaCl、0.015Mクエン酸ナトリウム、（pH7.0）〕、5×Denhardt's 溶液、5mM EDTA、0.1% SDS、10%デキストラン硫酸、100mg/ml 変性サケ精子DNAを有する溶液に溶解し、プローブ溶液とした。次に、前記ブロットメンブラン及び対照用メンブランのそれぞれと前記プローブ溶液とを、42℃16時間でインキュベーションして、ハイブリダイゼーションを行なった。得られたメンブランを、0.1×SSC、0.1% SDS 溶液で室温にて2回洗浄し、ついで、65℃にて2回洗浄した。洗浄後のメンブランフィルターを、XARフィルム（コダック社製）に曝して、感光させ、オートラジオグラムを得た。その結果を図2に示す。図2は、スロットブロッキングおよびサザンブロッキング解析結果を示す図である。

## 【0102】



図 2 に示すように、本発明の DNA 増幅方法によれば、ゲノム DNA 不死化ライブラリーが、元のゲノム DNA におけるコピー数の差を保持したまま増幅されていることが確認できる。また、TE 6 にてホモ欠失している p 1 6 に関しては、本発明のゲノム DNA 不死化ライブラリーにおいても検出されないことが確認できる。

【 0 1 0 3 】

実施例 3

(1) 鋳型ゲノム DNA 断片の調製

インフォームドコンセントのもと、得られた血液検体より、常法によりゲノム DNA を調製した。得られたゲノム DNA  $2 \mu\text{g}$  を  $200 \mu\text{l}$  の TE 緩衝液に溶解し、DNA 溶液を得た。得られた DNA 溶液を、実施例 1 記載の方法と同様に、ゲノム DNA を、断片化し、平滑末端化し、アダプターライゲーション処理した。

【 0 1 0 4 】

(2) 1st シャトル PCR

前記 (1) で調製したゲノム DNA 断片を鋳型として、ER1 プライマー  $100 \text{ pmol}$  と、 $10 \mu\text{l}$  の  $2.5 \text{ mM}$  dNTP ミックスと、5 U のタカラ Ex タック DNA ポリメラーゼ (宝酒造社製) と、 $10 \mu\text{l}$  の  $10 \times \text{PCR}$  用緩衝液とを添加し、滅菌水を用いて液量を  $100 \mu\text{l}$  にした。得られた溶液の入った反応チューブを TaKaRa PCR Thermal Cycler MP にセットし、以下の条件：

94℃、2 分保持、

94℃、15 秒 - 68℃、2 分を 1 サイクルとした 15 サイクル、  
で PCR を行なった。

【 0 1 0 5 】

(3) 2nd シャトル PCR

前記 (2) で得られた 1st シャトル PCR 溶液  $20 \mu\text{l}$  に、ER1 プライマー  $100 \text{ pmol}$  と、 $10 \mu\text{l}$  の  $2.5 \text{ mM}$  dNTP ミックスと、5 U のタカラ Ex タック DNA ポリメラーゼと、 $10 \mu\text{l}$  の  $10 \times \text{PCR}$  用緩衝液と

を添加し、滅菌水を用いて液量を100 $\mu$ lにした。得られた溶液の入った反応チューブをTaKaRa PCR Thermal Cycler MPにセットし、以下の条件：

94℃、2分保持、

94℃、15秒－68℃、2分を1サイクルとした5サイクル、  
でPCRを行なった。

【0106】

2nd PCR後、得られたゲノムDNA不死化ライブラリー量は、1st PCRにおける鋳型ゲノムDNA 1ngに対し、約10 $\mu$ gであった。

【0107】

(4) 本発明のDNAの増幅方法で調製したライブラリーの検討

上記(3)で調製したゲノムDNA不死化ライブラリーを鋳型として、遺伝子のエキソン解析を行なった。

【0108】

対象の遺伝子として、BRCA1遺伝子(ジーンバンク登録番号：U14680)、及びチミン-DNAグリコシラーゼ遺伝子(TDG：thymine-DNA glycosylase、ジーンバンク登録番号：NM 003211)を選択した。各遺伝子増幅用のプライマーの塩基配列を、それぞれ配列番号：28～61に示す。対照として、上記(1)で調製したゲノムDNAを鋳型としたPCRも同時に行なった。

【0109】

PCRは、以下の条件：

95℃、2分保持、

95℃、15秒－61℃、30秒－68℃、30秒を1サイクルとした30サイクル反応、  
で行なった。

【0110】

PCR後、得られた反応液5 $\mu$ lを1.5%アガロース電気泳動に供した。その結果、いずれの遺伝子においても、本発明の方法で調製したゲノムDNA不死

化ライブラリー由来の増幅パターンとゲノムDNA由来の増幅パターンとは同じであった。すなわち、ゲノムDNA不死化ライブラリーにおいて、遺伝子群のゲノム上における存在比率が保持されていることがわかる。

【0 1 1 1】

さらに、前記TDG遺伝子について、本発明の方法で調製したゲノムDNA不死化ライブラリー由来の増幅断片およびゲノムDNA由来の増幅断片それぞれの塩基配列を解析した。その結果を図3に示す。図3は、配列番号：58～59で示されるプライマーを用いてPCR増幅を行なったチミン-DNAグリコシラーゼ遺伝子断片の塩基配列を解析した結果を示す図である。

【0 1 1 2】

図3に示すように、塩基配列パターンは、ゲノムDNA不死化ライブラリー由来の増幅断片とゲノムDNA由来の増幅断片との間で同じである。このことから、本発明の方法で調製したライブラリーが、ゲノムDNAと塩基配列レベルにおいても同じであることがわかる。

【0 1 1 3】

(5) 本発明の方法により調製したライブラリーを用いたSNP解析

前記(4)で得られた増幅断片について、SNPパターンを検討した。

【0 1 1 4】

対象として、TDG遺伝子を選択した。本発明の方法で調製したゲノムDNA不死化ライブラリー及びゲノムDNAのそれぞれについて、配列番号：60～61で示される塩基配列を有するプライマーを用いて、PCR増幅を行なった。得られた増幅断片について、塩基配列を比較したところ、両者のSNPパターンは同じであることが確認できた。

【0 1 1 5】

実施例4 p53遺伝子の点突然変異

ゲノムDNA及び本発明の方法により調製したゲノムDNA不死化ライブラリーとして、実施例1記載の方法で調製したゲノムDNA及びゲノムDNA不死化ライブラリーを用いた。さらに対照として、実施例3記載の血液由来ゲノムDNAを用いた。プライマーとして、配列番号：62～63記載の塩基配列を有する

オリゴヌクレオチドを用いた。

【0116】

PCRは、以下の条件：

95℃、3分保持、

95℃、45秒－55℃、45秒－72℃、1分を1サイクルとした35サイクル反応、

72℃、10分保持、

で行なった。

【0117】

PCR後、得られた増幅断片の塩基配列を常法により解析した。その結果、健常人のp53遺伝子のコドン248の塩基配列がCGGであるのに対し、本発明の方法により調製されたゲノムDNA不死化ライブラリー由来の増幅断片及びゲノムDNA由来の増幅断片のp53遺伝子のコドン248の塩基配列は、いずれもCAGになっており、点突然変異があることが確認できた。すなわち、本発明のDNAの増幅方法によれば、元のゲノムDNAと同じ遺伝学的特徴を有するライブラリーを得ることができることがわかる。

【0118】

実施例5

(1) ゲノムDNAの断片化

Human Genomic DNA (クロンテック社製) 2  $\mu$ gを200  $\mu$ lのTE緩衝液に溶解した。得られたDNA溶液を実施例1の(1)と同様の方法で断片化し、断片化DNA溶液を得た。

【0119】

(2) 断片化DNAの平滑末端化－1

前記(1)で得られた断片化DNA溶液50  $\mu$ lに、12.5  $\mu$ lの5倍濃度BAL31ヌクレアーゼ反応用緩衝液を添加した。得られた溶液を、70℃で5分間インキュベーション後、30℃で5分間インキュベーションした。ついで、得られた溶液に、1.5UのBAL31ヌクレアーゼを添加し、30℃で1分間インキュベーションした。得られた反応液に、50  $\mu$ lの50mM EDTA溶

液を添加し、BAL31ヌクレアーゼ処理DNA溶液を得た。

【0120】

(3) 断片化DNAの平滑末端化-2

BAL31ヌクレアーゼ処理したDNA溶液112.5 $\mu$ lを、マイクロコン-100（宝酒造社製）を用いて精製した。ついで、得られた精製物に、5 $\mu$ lの10倍濃度Blunting buffer（宝酒造社製）と45 $\mu$ lの滅菌水とを添加し、得られた溶液のうちの40 $\mu$ lに、5UのPyroBEST DNAポリメラーゼ（宝酒造社製）を添加し、74℃で10分間インキュベーションした後、4℃に冷却した。

【0121】

(4) アダプターライゲーション

前記(3)で得られた平滑末端処理済DNA2 $\mu$ l（約0.02 $\mu$ g相当）に500pmolのEcoRI-NotI-BamHIアダプター（宝酒造社製）を添加した。得られた溶液とライゲーションキットver. 2（宝酒造社製）とを用いて、ライゲーション溶液を調製した。前記ライゲーション溶液を16℃で30分間インキュベーションし、アダプターライゲーション処理DNA溶液を得た。

【0122】

(5) 1st PCR

前記(4)で得られたアダプターライゲーション処理DNA溶液1 $\mu$ lに、実施例1で使用したER1プライマー100pmolと、10 $\mu$ lの2.5mM dNTPミックスと、5UのタカラEx タック DNAポリメラーゼと、10 $\mu$ lの10×PCR用緩衝液とを添加し、滅菌水を用いて液量を100 $\mu$ lにした。得られた溶液の入った反応チューブをTaKaRa PCR Thermal Cycler MPにセットし、以下の条件：

95℃、5分保持、

95℃、1分-72℃、3分を1サイクルとした15サイクル、

72℃、10分保持

でPCRを行なった。

【0123】

(6) 2nd PCR

1st PCR 溶液 20  $\mu$ l に、ER1 プライマー 100 pmol と、10  $\mu$ l の 2.5 mM dNTP ミックスと、5 U のタカラ Ex Taq DNA ポリメラーゼと、10  $\mu$ l の 10×PCR 用緩衝液とを添加し、滅菌水を用いて液量を 100  $\mu$ l にした。該反応液の入った反応チューブを TaKaRa PCR Thermal Cycler MP にセットし、以下の条件：

95℃、5分保持、

95℃、1分－72℃、3分を1サイクルとした5サイクル、

72℃、10分保持

でPCRを行なった。これにより、ゲノムDNA不死化ライブラリーを得た。

【0124】

(7) ゲノム不死化の確認

前記(1)で得られた断片化DNA 5  $\mu$ l と、実施例1で得られたゲノムDNA不死化ライブラリーおよび前記(6)で得られたゲノムDNA不死化ライブラリーそれぞれ 5  $\mu$ l とを電気泳動した結果を図4に示す。図4において、レーンMはpHY分子量マーカー、レーン1は断片化DNA、レーン2は実施例1で調製したライブラリー、レーン3は本実施例で調製されたライブラリーの場合を示す。

【0125】

図4は、電気泳動写真を示す図である。図4に示すように、実施例1及び実施例5のいずれのゲノムDNA不死化ライブラリーにおいても、ゲノムDNAと同一の電気泳動パターンであることがわかる。

【0126】

ゲノムDNAおよび前記(6)で得られたゲノムDNA不死化ライブラリーを鋳型として用いて、PCRを行なった。対象として、ヒトCD59遺伝子(ジーンバンク登録番号:M34671)、ヒトDNAトポイソメラーゼI遺伝子(ジーンバンク登録番号:J03250)、及びヒトATP依存型DNAヘリカーゼII遺伝子(ジーンバンク登録番号:M32865)の3種類の遺伝子を選択し

た。また、使用するプライマーの塩基配列を配列番号：64～69に示す。前記プライマーの組み合わせにより、ヒトCD59遺伝子については、770bp、ヒトDNAトポイソメラーゼI遺伝子については、791bp、ヒトATP依存型DNAヘリカーゼII遺伝子については、692bpのサイズの増幅断片が得られることが予想される。

【0127】

PCRは、以下の条件：

94℃ 10秒－56℃ 20秒－72℃ 30秒を1サイクルとする40サイクル

72℃ 3分保持

で行なった。

【0128】

PCR終了後、該反応液5 $\mu$ lを用いて、常法によりDNA塩基配列を確認したところ、全てにおいて目的とするDNA配列が得られた。

【0129】

したがって、本方法により増幅されたゲノムDNAは、元のゲノムDNAの塩基配列を損なうことなく増幅されていることがわかる。このことより、本発明の方法は、元のゲノムDNAと同じ遺伝子パターンを有するゲノムDNA不死化ライブラリーを構築できることがわかる。

【0130】

実施例6

$\lambda$ ファージのDNAを慣用の手法により単離した。ついで、得られた $\lambda$ DNAを基質として、各種制限酵素EcoT14I；EcoT14IとBglIIとの混合物；BstPI；又はHindIIIにより切断した。その結果を、図5に示す。

【0131】

図5に示されるように、幅広い範囲にわたる断片化DNAが生じ、任意のサイズで収束させて断片化することができないことがわかる。

【0132】

また、かかる断片化DNAについて、実施例1と同様の操作によりライブラリーを作製したところ得られた断片の増幅様式において、ゲノムDNAの制限酵素切断パターンに対応するバンド強度とは、異質のバンド強度が見出されることがわかる。したがって、ゲノムDNAにおけるコピー数などを反映できないことがわかる。

【0133】

#### 実施例7

下記試薬を含有したキットを構築した。

- (1) T4 DNAリガーゼ、
- (2) BAL31ヌクレアーゼ及びDNAブランディングキット（宝酒造社製）、
- (3) タカラExタック DNAポリメラーゼ、
- (4) EcoRI-NotI-BamHIアダプター、
- (5) dNTPsミックス、10×タカラExタックDNAポリメラーゼ用反応緩衝液、滅菌水、
- (6) 配列番号：1に記載のER1プライマー、

【0134】

上記キット及び実施例1記載の断片化DNAを用いて本発明のゲノムDNA不死化ライブラリーを調製した。その結果、実施例1と同様に元のゲノムDNAの遺伝子パターンを保持したゲノムDNA不死化ライブラリーを作製できることを確認した。

【0135】

#### 配列表フリーテキスト

配列番号：1は、ER1プライマーの配列である。

【0136】

配列番号：2は、APC遺伝子増幅用プライマーの配列である。

【0137】

配列番号：3は、APC遺伝子増幅用プライマーの配列である。

【0138】

配列番号：4は、APC遺伝子増幅用プライマーの配列である。



【0139】

配列番号：5は、APC遺伝子増幅用プライマーの配列である。

【0140】

配列番号：6は、APC遺伝子増幅用プライマーの配列である。

【0141】

配列番号：7は、APC遺伝子増幅用プライマーの配列である。

【0142】

配列番号：8は、APC遺伝子増幅用プライマーの配列である。

【0143】

配列番号：9は、APC遺伝子増幅用プライマーの配列である。

【0144】

配列番号：10は、APC遺伝子増幅用プライマーの配列である。

【0145】

配列番号：11は、APC遺伝子増幅用プライマーの配列である。

【0146】

配列番号：12は、APC遺伝子増幅用プライマーの配列である。

【0147】

配列番号：13は、APC遺伝子増幅用プライマーの配列である。

【0148】

配列番号：14は、APC遺伝子増幅用プライマーの配列である。

【0149】

配列番号：15は、APC遺伝子増幅用プライマーの配列である。

【0150】

配列番号：16は、APC遺伝子増幅用プライマーの配列である。

【0151】

配列番号：17は、APC遺伝子増幅用プライマーの配列である。

【0152】

配列番号：18は、APC遺伝子増幅用プライマーの配列である。

【0153】

配列番号：19は、APC遺伝子増幅用プライマーの配列である。

【0154】

配列番号：20は、CAB1遺伝子増幅用プライマーの配列である。

【0155】

配列番号：21は、CAB1遺伝子増幅用プライマーの配列である。

【0156】

配列番号：22は、サイクリンD1遺伝子増幅用プライマーの配列である。

【0157】

配列番号：23は、サイクリンD1遺伝子増幅用プライマーの配列である。

【0158】

配列番号：24は、サイクリンE1遺伝子増幅用プライマーの配列である。

【0159】

配列番号：25は、サイクリンE1遺伝子増幅用プライマーの配列である。

【0160】

配列番号：26は、p16遺伝子増幅用プライマーの配列である。

【0161】

配列番号：27は、p16遺伝子増幅用プライマーの配列である。

【0162】

配列番号：28は、BRCA1遺伝子増幅用プライマーの配列である。

【0163】

配列番号：29は、BRCA1遺伝子増幅用プライマーの配列である。

【0164】

配列番号：30は、BRCA1遺伝子増幅用プライマーの配列である。

【0165】

配列番号：31は、BRCA1遺伝子増幅用プライマーの配列である。

【0166】

配列番号：32は、BRCA1遺伝子増幅用プライマーの配列である。

【0167】

配列番号：33は、BRCA1遺伝子増幅用プライマーの配列である。

【0168】

配列番号：34は、BRCA1遺伝子増幅用プライマーの配列である。

【0169】

配列番号：35は、BRCA1遺伝子増幅用プライマーの配列である。

【0170】

配列番号：36は、BRCA1遺伝子増幅用プライマーの配列である。

【0171】

配列番号：37は、BRCA1遺伝子増幅用プライマーの配列である。

【0172】

配列番号：38は、BRCA1遺伝子増幅用プライマーの配列である。

【0173】

配列番号：39は、BRCA1遺伝子増幅用プライマーの配列である。

【0174】

配列番号：40は、BRCA1遺伝子増幅用プライマーの配列である。

【0175】

配列番号：41は、BRCA1遺伝子増幅用プライマーの配列である。

【0176】

配列番号：42は、BRCA1遺伝子増幅用プライマーの配列である。

【0177】

配列番号：43は、BRCA1遺伝子増幅用プライマーの配列である。

【0178】

配列番号：44は、BRCA1遺伝子増幅用プライマーの配列である。

【0179】

配列番号：45は、BRCA1遺伝子増幅用プライマーの配列である。

【0180】

配列番号：46は、BRCA1遺伝子増幅用プライマーの配列である。

【0181】

配列番号：47は、BRCA1遺伝子増幅用プライマーの配列である。

【0182】

配列番号：48は、BRCA1遺伝子増幅用プライマーの配列である。

【0183】

配列番号：49は、BRCA1遺伝子増幅用プライマーの配列である。

【0184】

配列番号：50は、BRCA1遺伝子増幅用プライマーの配列である。

【0185】

配列番号：51は、BRCA1遺伝子増幅用プライマーの配列である。

【0186】

配列番号：52は、BRCA1遺伝子増幅用プライマーの配列である。

【0187】

配列番号：53は、BRCA1遺伝子増幅用プライマーの配列である。

【0188】

配列番号：54は、BRCA1遺伝子増幅用プライマーの配列である。

【0189】

配列番号：55は、BRCA1遺伝子増幅用プライマーの配列である。

【0190】

配列番号：56は、BRCA1遺伝子増幅用プライマーの配列である。

【0191】

配列番号：57は、BRCA1遺伝子増幅用プライマーの配列である。

【0192】

配列番号：58は、TDG遺伝子増幅用プライマーの配列である。

【0193】

配列番号：59は、TDG遺伝子増幅用プライマーの配列である。

【0194】

配列番号：60は、TDG遺伝子増幅用プライマーの配列である。

【0195】

配列番号：61は、TDG遺伝子増幅用プライマーの配列である。

【0196】

配列番号：62は、p53遺伝子増幅用プライマーの配列である。

【0197】

配列番号：63は、p53遺伝子増幅用プライマーの配列である。

【0198】

配列番号：64は、CD59遺伝子増幅用プライマーの配列である。

【0199】

配列番号：65は、CD59遺伝子増幅用プライマーの配列である。

【0200】

配列番号：66は、トポイソメラーゼI遺伝子増幅用プライマーの配列である。

【0201】

配列番号：67は、トポイソメラーゼI遺伝子増幅用プライマーの配列である。

【0202】

配列番号：68は、ATP依存型DNAヘリカーゼ遺伝子増幅用プライマーの配列である。

【0203】

配列番号：69は、ATP依存型DNAヘリカーゼ遺伝子増幅用プライマーの配列である。

【0204】

【発明の効果】

本発明のDNAの増幅方法によれば、得られたゲノムDNAライブラリーにおいて、ゲノムDNAにおけるコピー数と、該遺伝子群又は配列のゲノム上における存在比率とが保持され、ゲノムDNAと同一の多型パターンが保持されるという優れた効果を奏する。また、本発明のゲノムDNAライブラリーは、ゲノムDNAにおけるコピー数と、該遺伝子群又は配列のゲノム上における存在比率とが保持され、ゲノムDNAと同一の多型パターンが保持されるため、診断、研究などの分野において有用である。また、本発明のDNA増幅用キットによれば、本発明のDNA増幅方法を簡便に行なうことができる。

【 0 2 0 5 】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> TAKARA SHUZO CO., LTD.

<110> National Cancer Center

<110> The organization for Pharmaceutical Safety and Research

<120> Method for amplifying DNA

<130> TS-13-004

<160> 69

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: a sequence for ER1 primer

<400> 1

ggaattcggc ggccgcggat cc

22

【 0 2 0 6 】

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: a sequence of a primer for amplifying APC gene

<400> 2

caactcctaattagatgaccc a

21

【 0 2 0 7 】

<210> 3

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: a sequence of a primer for amplifying APC gene

<400> 3

gagagtatgaattctgtact t

21

【 0 2 0 8 】

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: a sequence of a primer for amplifying APC gene

<400> 4

cagacttatt gtgtagaaga

20

【 0 2 0 9 】

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: a sequence of a primer for amplifying APC gene

<400> 5

ctcctgaaga aaattcaaca

20

【 0 2 1 0 】

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: a sequence of a primer for amplifying APC gene

<400> 6



actccagatg gattttcttg

20

【 0 2 1 1 】

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: a sequence of a primer for amplifying APC gene

<400> 7

ggctggcttt tttgctttac

20

【 0 2 1 2 】

<210> 8

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: a sequence of a primer for amplifying APC gene

<400> 8

gtcgtaatTT tgtttctaaa ctc

23

【 0 2 1 3 】

<210> 9

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: a sequence of a primer for amplifying APC gene

<400> 9

tgaaggactc ggatttcacg c

21

【 0 2 1 4 】

<210> 10

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: a sequence of a primer for amplifying APC gene

<400> 10

atttgaatac tacagtgtta ccc

23

【 0 2 1 5 】

<210> 11

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: a sequence of a primer for amplifying APC gene

<400> 11

cttgatttct aatttgcat aagg

24

【 0 2 1 6 】

<210> 12

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: a sequence of a primer for amplifying APC gene

<400> 12

gttactgcat acacattgtg ac

22

【 0 2 1 7 】

<210> 13

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: a sequence of a primer for amplifying APC gene

<400> 13

acttctatct tttcagaac gag

23

【 0 2 1 8 】

<210> 14

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: a sequence of a primer for amplifying APC gene

<400> 14

atttgaatac tacagtgtta ccc

23

【 0 2 1 9 】

<210> 15

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: a sequence of a primer for amplifying APC gene

<400> 15

gtttctcttc atttatatatt atgcta

26

【 0 2 2 0 】

<210> 16

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: a sequence of a primer for amplifying APC gene

<400> 16

aagcctacca attatagtga acg

23

【 0 2 2 1 】

<210> 17

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: a sequence of a primer for amplifying APC gene

<400> 17

ggctggccttt ttgctttac

20

【 0 2 2 2 】

<210> 18

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: a sequence of a primer for amplifying APC gene

<400> 18

ctgccatgcc aacaaagtca

20

【 0 2 2 3 】

<210> 19

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: a sequence of a primer for amplifying APC gene

<400> 19

cttttttggc attgcggagc t

21

【 0 2 2 4 】

<210> 20

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: a sequence of a primer for amplifying cyclin D1 gene

<400> 20

atgagcaagc tgcccaggga

20

【 0 2 2 5 】

<210> 21

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: a sequence of a primer for amplifying CAB1 gene

<400> 21

tcacgcccgg gccccagct

20

【 0 2 2 6 】

<210> 22

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: a sequence of a primer for amplifying cyclin E1 gene

<400> 22

atggaacacc agctcctgtg

20

【 0 2 2 7 】

<210> 23

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: a sequence of a primer for amplifying cyclin E1 gene

<400> 23

tcagatgtcc acgtcccgcgca

20

【 0 2 2 8 】

<210> 24

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: a sequence of a primer for amplifying cyclin E1 gene

<400> 24

gtgctcaccc ggcccgggtgc

20

【 0 2 2 9 】

<210> 25

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: a sequence of a primer for amplifying cyclin E1 gene

<400> 25

ggagagggt gcccccctgcc

20

【 0 2 3 0 】

<210> 26

<211> 20



<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: a sequence of a primer for amplifying p16 gene

<400> 26

atggagccgg cggcggggag

20

【 0 2 3 1 】

<210> 27

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: a sequence of a primer for amplifying p16 gene

<400> 27

tcaatcgggg atgtctgagg

20

【 0 2 3 2 】

<210> 28

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: a sequence of a primer for amp

lifying BRCA1 gene

<400> 28

acctgccaca gtagatgctc ag

22

【 0 2 3 3 】

<210> 29

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: a sequence of a primer for amplifying BRCA1 gene

<400> 29

actgcacata catccctgaa cc

22

【 0 2 3 4 】

<210> 30

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: a sequence of a primer for amplifying BRCA1 gene

<400> 30

ggagagagca gctttcacta ac

22

【 0 2 3 5 】

<210> 31

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: a sequence of a primer for amplifying BRCA1 gene

<400> 31

ccataccacg acatttgaca gag

23

【 0 2 3 6 】

<210> 32

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: a sequence of a primer for amplifying BRCA1 gene

<400> 32

taggtgtggt ttctgcatag gg

22

【 0 2 3 7 】

<210> 33

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: a sequence of a primer for amplifying BRCA1 gene

<400> 33

gtccgcctat cattacatgt ttcc

24

【 0 2 3 8 】

<210> 34

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: a sequence of a primer for amplifying BRCA1 gene

<400> 34

aacaccactg agaagcgtgc ag

22

【 0 2 3 9 】

<210> 35

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: a sequence of a primer for amplifying BRCA1 gene

<400> 35

ccatcatgtg agtcatcaga ac

22

【0240】

<210> 36

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: a sequence of a primer for amplifying BRCA1 gene

<400> 36

caacataaca gatgggctgg aag

23

【0241】

<210> 37

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: a sequence of a primer for amplifying BRCA1 gene

<400> 37

aggcttgcct tcttccgata gg

22

【0242】

<210> 38

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: a sequence of a primer for amplifying BRCA1 gene

<400> 38

ggcatcatatc atgttagctg actg

24

【 0 2 4 3 】

<210> 39

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: a sequence of a primer for amplifying BRCA1 gene

<400> 39

tcttcaaggt gggaactgcg tc

22

【 0 2 4 4 】

<210> 40

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: a sequence of a primer for amplifying BRCA1 gene

<400> 40

ctcgttactg gaagtttagca ctc

23

【 0 2 4 5 】

<210> 41

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: a sequence of a primer for amplifying BRCA1 gene

<400> 41

aaccacagga aagcctgcag tg

22

【 0 2 4 6 】

<210> 42

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: a sequence of a primer for amplifying BRCA1 gene

<400> 42

ttggtctttt ctgtccctcc catc

24

【 0 2 4 7 】

<210> 43

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: a sequence of a primer for amplifying BRCA1 gene

<400> 43

ttcacaaacgc cttacgcctc tc

22

【 0 2 4 8 】

<210> 44

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: a sequence of a primer for amplifying BRCA1 gene

<400> 44

aggacacgtg tagaacgtgc ag

22

【 0 2 4 9 】

<210> 45

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>



<223> Description of Artificial Sequence: a sequence of a primer for amplifying BRCA1 gene

<400> 45

tcctaattctc gtgatctgcc cg

22

【 0 2 5 0 】

<210> 46

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: a sequence of a primer for amplifying BRCA1 gene

<400> 46

agcctctgat tctgtcacca gg

22

【 0 2 5 1 】

<210> 47

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: a sequence of a primer for amplifying BRCA1 gene

<400> 47

cagcatcacc agcttatctg aac

23

【 0 2 5 2 】

<210> 48

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: a sequence of a primer for amplifying BRCA1 gene

<400> 48

gaactggaat atgccttgag gg

22

【 0 2 5 3 】

<210> 49

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: a sequence of a primer for amplifying BRCA1 gene

<400> 49

tctcaatggc gcaaattgat cc

22

【 0 2 5 4 】

<210> 50

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: a sequence of a primer for amplifying BRCA1 gene

<400> 50

ccaaagtgt aggattacag gg

22

【 0 2 5 5 】

<210> 51

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: a sequence of a primer for amplifying BRCA1 gene

<400> 51

cctgtgtgaa agtatctagc actg

24

【 0 2 5 6 】

<210> 52

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: a sequence of a primer for amplifying BRCA1 gene

<400> 52

cagaaatcat caggtggtga acag

24

【 0 2 5 7 】

<210> 53

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: a sequence of a primer for amplifying BRCA1 gene

<400> 53

accttcatgc tcttgagaag gg

22

【 0 2 5 8 】

<210> 54

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: a sequence of a primer for amplifying BRCA1 gene

<400> 54

gagacagact ctccattga gag

23

【 0 2 5 9 】

<210> 55

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: a sequence of a primer for amplifying BRCA1 gene

<400> 55

atgtgggcag agaagacttc tg

22

【 0 2 6 0 】

<210> 56

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: a sequence of a primer for amplifying BRCA1 gene

<400> 56

attgcgccat cacactctag cc

22

【 0 2 6 1 】

<210> 57

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: a sequence of a primer for amp

lifying BRCA1 gene

<400> 57

acccttgcat agccagaagt cc

22

【 0 2 6 2 】

<210> 58

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: a sequence of a primer for amplifying TDG gene

<400> 58

agcatggcctt tcttcttcct gtgc

24

【 0 2 6 3 】

<210> 59

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: a sequence of a primer for amplifying TDG gene

<400> 59

cagacacaga aactctctgc tatg

24

【 0 2 6 4 】

<210> 60

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: a sequence of a primer for amplifying TDG gene

<400> 60

caccatatgc tgcctcataa cc

22

【 0 2 6 5 】

<210> 61

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: a sequence of a primer for amplifying TDG gene

<400> 61

aacatggtgg aaaggaccac gc

22

【 0 2 6 6 】

<210> 62

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: a sequence of a primer for amplifying p53 gene

<400> 62

atcctggcta acggtgaaac cc

22

【 0 2 6 7 】

<210> 63

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: a sequence of a primer for amplifying p53 gene

<400> 63

tgatgagagg tggatgggta gtag

24

【 0 2 6 8 】

<210> 64

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: a sequence of a primer for amplifying CD59 gene

<400> 64



tctcacatgg aacgctttc

19

【 0 2 6 9 】

<210> 65

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: a sequence of a primer for amplifying CD59 gene

<400> 65

taaatacagc caagatcata a

21

【 0 2 7 0 】

<210> 66

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: a sequence of a primer for amplifying topoisomerase I gene

<400> 66

ggaatttgtc agcgttctac

20

【 0 2 7 1 】

<210> 67

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: a sequence of a primer for amplifying topoisomerase I gene

<400> 67

caatgcctgt aaaactaatg a

21

【 0 2 7 2 】

<210> 68

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: a sequence of a primer for amplifying ATP dependent DNA helicase gene

<400> 68

ccctccctgt tcgtgtaccc

20

【 0 2 7 3 】

<210> 69

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: a sequence of a primer for amplifying ATP dependent DNA helicase gene

&lt;400&gt; 69

agaccactct tcagcccgta a

21

## 【図面の簡単な説明】

## 【図 1】

図 1 は、ゲノム DNA 不死化ライブラリーについて、元のゲノム DNA に存在する遺伝子の有無を調べた結果を示す図である。図中、○は、元のゲノム DNA を示し、△は、ゲノム DNA 不死化ライブラリーを示す。

## 【図 2】

図 2 は、ゲノム DNA 不死化ライブラリーについて、CAB1 遺伝子、サイクリン D1 遺伝子、サイクリン E 遺伝子及び p16 遺伝子の各遺伝子のコピー数の差を調べた結果を示す図である。なお、p16 遺伝子は、高 GC 含量の配列を有する。

## 【図 3】

図 3 は、配列番号：58～59 で示されるプライマーを用いて PCR 増幅を行ったチミン-DNA グリコシラーゼ遺伝子断片の塩基配列を解析した結果を示す図である。パネル A は、ゲノム DNA 不死化ライブラリーの解析結果を示し、パネル B は、ゲノム DNA の解析結果を示す。

## 【図 4】

図 4 は、断片化 DNA と、ゲノム DNA 不死化ライブラリーとの電気泳動パターンを示す図である。図中、レーン M は、pHY マーカーを示し、レーン 1 は、ヒトゲノム DNA を示し、レーン 2 は、実施例 1 で得られたゲノム DNA 不死化ライブラリーを示し、レーン 3 は、実施例 5 で得られたゲノム DNA 不死化ライブラリーを示す。

## 【図 5】

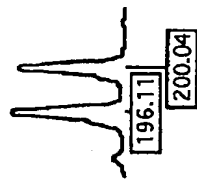
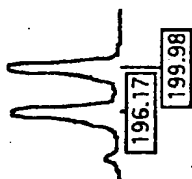
図 5 は、λ DNA を各種制限酵素 EcoT14I；EcoT14I と BglI I との混合物；BstPI；又は HindIII により切断した場合の電気泳動

パターンを示す模式図である。

【書類名】 図面

【図1】

D3S3038



BAT23

対照1 O A 対照2



D2S337

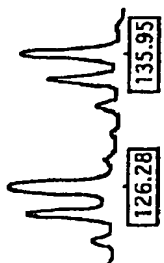


D17S250

対照1 O A 対照2



D3S1292

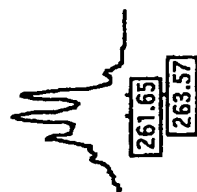
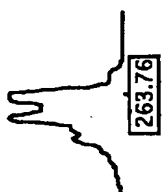


D5S346

対照1 O A 対照2



D4S1535



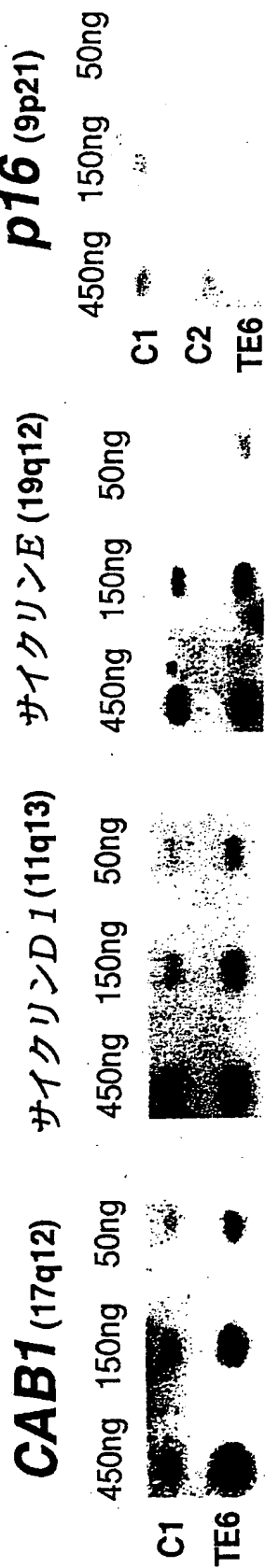
D2S123

対照1 O A 対照2

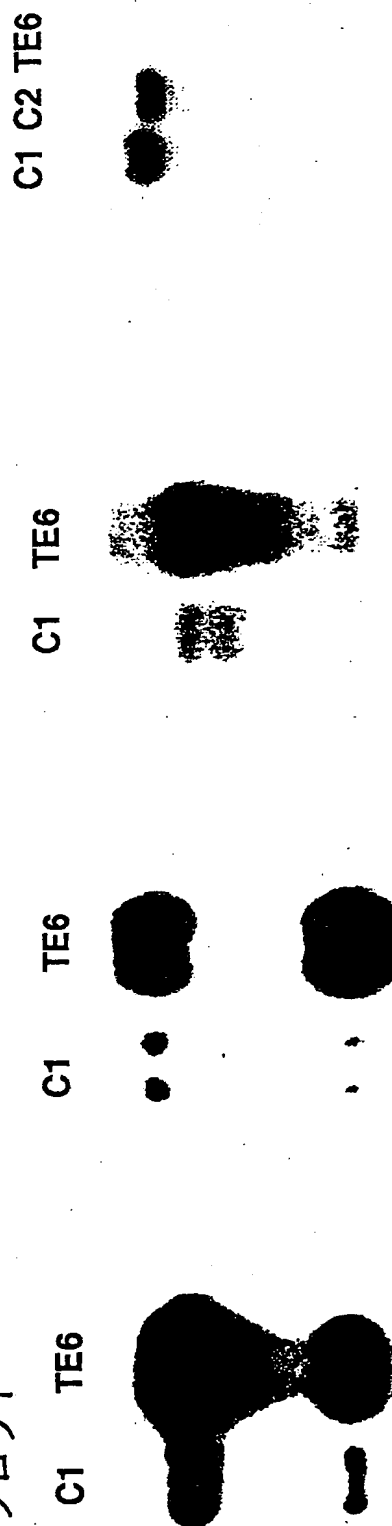


【図2】

スロットブロット



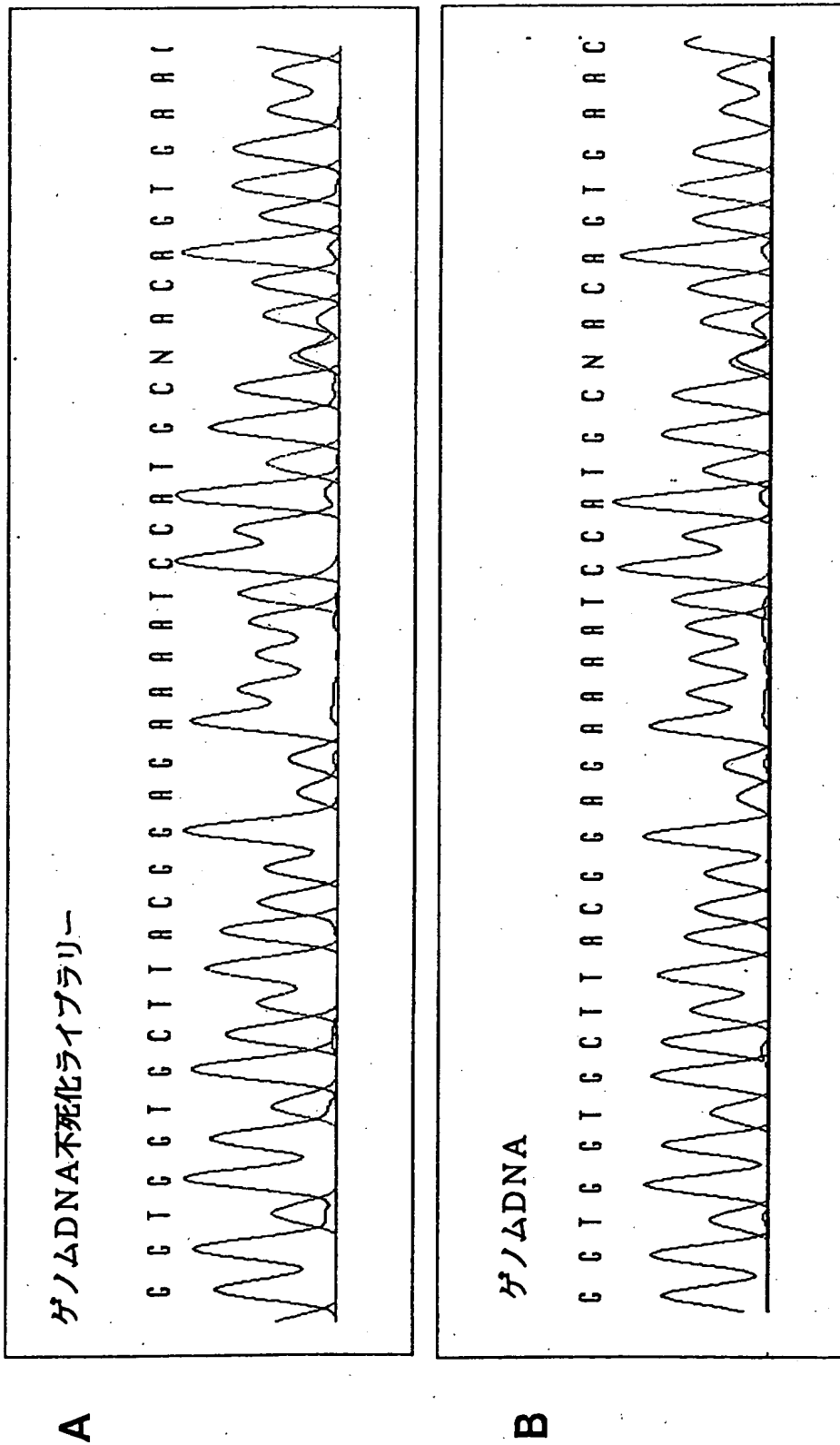
サザンブロット



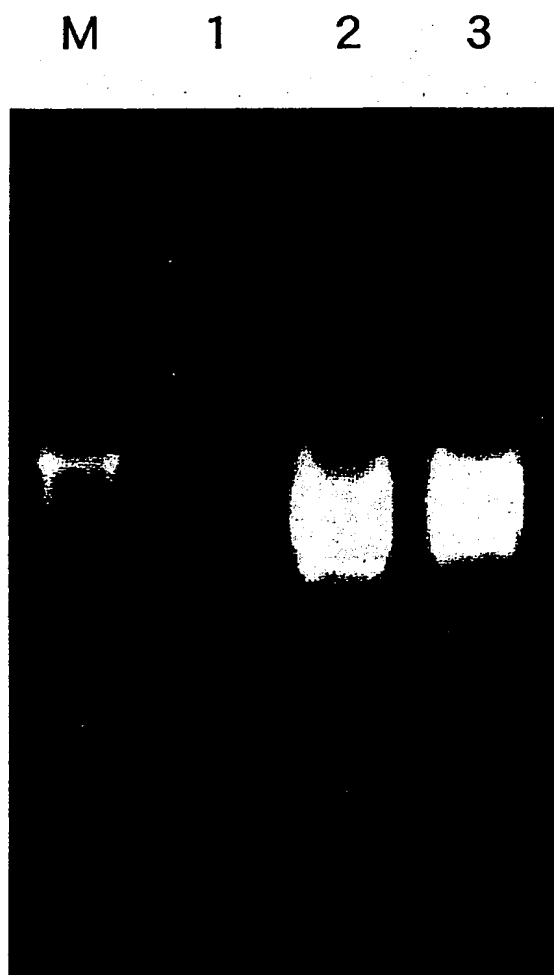
遺伝子増幅

ホモ接合性の欠失

【図 3】



【図4】





【図 5】

$\lambda$ -EcoT14 I 消化	$\lambda$ -EcoT14 I/Bgl II 消化	$\lambda$ -BstPI 消化	$\lambda$ -Hind III 消化
bp — — 19329	bp — — 22010 — — 18328 — — 13286 — — 9888 — — 7743 — — 6223 — — 4254 — — 3472 — — 2690 — — 2392 — — 1882 — — 1489	bp — — 8453 — — 7242 — — 5687 — — 4822 — — 4324 — — 3675 — — 2323 — — 1929 — — 1371 — — 1264	bp — — 23130 — — 9416 — — 6557 — — 4361 — — 2322 — — 2027
— — 421	— — 925 — — 651 — — 421 — — 415	— — 702	— — 564
— — 74	— — 74 — — 60	— — 224	— — 117
— — 74			— — 125

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】

得られたDNA断片において、ゲノム上における遺伝子群又は配列のコピー数と、該遺伝子群又は配列のゲノム上における存在比率とが保持されうるDNA増幅方法を提供すること。

【解決手段】

最小サイズの断片化DNAに対する最大サイズの断片化DNAのサイズ比（分散比）として、1～5の分散比であり、かつ80%以上のサイズ収束率を有する断片化DNAを調製可能なDNA断片化手段により、ゲノムDNAを処理して断片化DNAを得、核酸増幅反応により該断片化DNAに対応するDNAを増幅して、ゲノム上における遺伝子群又は配列のコピー数と、該遺伝子群又は配列のゲノム上における存在比率とを保持したDNAを得るDNA増幅方法；ゲノムDNA上における遺伝子群又は配列のコピー数と該遺伝子群又は配列のゲノム上における存在比率とを保持したゲノムDNAライブラリー；並びにDNA増幅方法を行ない、ゲノムDNAライブラリーを調製するためのキット。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2001-137858
受付番号	50100663057
書類名	特許願
担当官	宇留間 久雄 7277
作成日	平成13年 6月19日

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】	591038141
【住所又は居所】	京都府京都市伏見区竹中町609番地
【氏名又は名称】	寶酒造株式会社

【特許出願人】

【識別番号】	590001452
【住所又は居所】	東京都中央区築地5丁目1番1号
【氏名又は名称】	国立がんセンター総長

【特許出願人】

【識別番号】	598004952
【住所又は居所】	東京都千代田区霞が関3丁目3番2号 新霞が関ビル9階

【氏名又は名称】	医薬品副作用被害救済・研究振興調査機構
----------	---------------------

【代理人】

申請人	
【識別番号】	100095832
【住所又は居所】	大阪府大阪市中央区谷町2丁目8番1号 大手前M2ビル5階 細田国際特許事務所
【氏名又は名称】	細田 芳徳

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [591038141]

1. 変更年月日	1991年 2月 4日
[変更理由]	新規登録
住 所	京都府京都市伏見区竹中町609番地
氏 名	寶酒造株式会社

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [598139461]

1. 変更年月日 1998年 9月25日  
[変更理由] 新規登録  
住 所 東京都中央区築地5-1-1 国立がんセンター内  
氏 名 国立がんセンター総長
2. 変更年月日 1998年10月26日  
[変更理由] 識別番号の統合による抹消  
[統合先識別番号] 590001452  
住 所 東京都中央区築地5-1-1 国立がんセンター内  
氏 名 国立がんセンター総長

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [590001452]

1. 変更年月日 1998年10月26日

[変更理由] 識別番号の二重登録による統合

[統合元識別番号] 598139461

住 所 東京都中央区築地5丁目1番1号

氏 名 国立がんセンター総長

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [598004952]

1. 変更年月日 1997年12月17日

[変更理由] 新規登録

住 所 東京都千代田区霞が関3丁目3番2号 新霞が関ビル9階

氏 名 医薬品副作用被害救済・研究振興調査機構